

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 8 月 15 日 (15.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/062817 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 21/04, 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/01108
- (22) 国際出願日: 2002 年 2 月 8 日 (08.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-032030 2001 年 2 月 8 日 (08.02.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱
レイヨン株式会社 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号
Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浦垣 俊孝 (URA-
GAKI, Toshitaka) [JP/JP]; 〒108-8506 東京都港区港
南1丁目6番41号 三菱レイヨン株式会社内 Tokyo (JP).
渡辺 文昭 (WATANABE, Fumiaki) [JP/JP]; 〒230-0053
神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨ
ン株式会社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP). 長浜
千秋 (NAGAHAMA, Chiaki) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈
川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株
- 式会社 化成品開発研究所内 Kanagawa (JP). 湯 不二夫
(YU, Fujio) [JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区
大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 化成品開発研
究所内 Kanagawa (JP). 菊池 克明 (KIKUCHI, Katsuaki)
[JP/JP]; 〒230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10
番1号 三菱レイヨン株式会社 化成品開発研究所内
Kanagawa (JP). 吉岡 彰 (YOSHIOKA, Akira) [JP/JP]; 〒
230-0053 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三
菱レイヨン株式会社 化成品開発研究所内 Kanagawa
(JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル 3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING VINYLATED NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: ビニル化核酸の製造方法

(57) Abstract: A process for efficiently and economically producing a vinylated nucleic acid by subjecting an amino-containing nucleic acid to a vinylation reaction with a vinylating agent. A method of economically and efficiently producing a vinylated nucleic acid by a method which comprises performing PCR in the presence of an amino-modified nucleotide and dNTP to thereby introduce vinyl group into the amplified PCR product, or by a method which comprises performing PCR in the presence of a vinyl-modified nucleotide and dNTP.

(57) 要約:

アミノ基を有する核酸をビニル化剤とビニル化反応を実施することにより、効
率良く且つ安価にビニル化核酸を製造する方法を提供する。また、アミノ基で修
飾したヌクレオチド及び dNTP の存在下で PCR を行って、得られた PCR 増幅産物
にビニル基を導入する方法、又はビニル基で修飾したヌクレオチド及び dNTP の
存在下で PCR を行う方法により、ビニル化核酸を効率良く且つ安価に製造する方
法を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/062817 A1



許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

ビニル化核酸の製造方法

技術分野

本発明は、ビニル基を有するビニル化核酸の製造方法に関する。ビニル化核酸は、基盤等に固定し遺伝子発現、遺伝子変異等の検出のためのプローブに使用される。

背景技術

近年、ゲノム又は遺伝子情報を解析するための装置として、DNAマイクロアレイやマイクロ電気泳動装置等が開発されている。

例えば、本発明者らの一部も、ゲルを利用した DNA マイクロアレイを開発し、出願している（日本国 特開 2000-270877 号、特開 2000-270878 号、特開 2000-270879 号公報参照）。この DNA マイクロアレイは、繊維に核酸固定化ゲルを保持した繊維配列体を作製し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより得られる。

ゲルに核酸を固定化する方法としては、例えば、ビニル化剤としてAcrylamide phosphoramidite (AcryditeTM) を用いて、末端ビニル化核酸を作成し、これをアクリルアミドモノマーと共重合させることにより核酸をポリアクリルアミド中に固定化する方法が知られている（Nucleic Acid Res., 27, 2649 (1999)、WO 98/39351号公報参照参照）。しかし、前記核酸へのビニル基の導入反応は、不安定であるため、収率よくビニル基を導入することができない（BioTechniques 27:592-606 (1999)）。また、ホスホロアミダイト試薬が高価であることから、経済的ではない。

発明の開示

本発明は、効率よく且つ安価にビニル化核酸を製造する方法を提供することを

目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、アミノ基を有する核酸と、ビニル化剤とを反応させ、必要に応じて、塩基性化合物存在下でビニル化反応を行うことにより、効率よく且つ安価にビニル化核酸が製造できることを見出し、本発明を完成させた。

また、本発明者らは、アミノ基修飾ヌクレオチドの共存下に PCR を行って、得られた PCR 増幅産物にビニル基を導入する方法、又はビニル基を有するヌクレオチド存在下に PCR を行うことで、効率よく且つ安価にビニル化核酸を製造することができることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、(1) アミノ基を有する核酸をビニル化剤とビニル化反応させることを含むビニル化核酸の製造方法、(2) アミノ基を有する核酸が PCR により得られるものである (1) に記載のビニル化核酸の製造方法、(3) アミノ基を有する核酸が、アミノ基で修飾したヌクレオチド及び dNTP の存在下で PCR を行い、得られるものである (1) に記載のビニル化核酸の製造方法、(4) ビニル化剤がアクリル酸無水物、メタクリル酸無水物、N-アクリロイルオキシスクシンイミド及びN-メタクリロイルオキシスクシンイミドからなる群から選択される少なくとも1種である (1) ~ (3) のいずれかに記載のビニル化核酸の製造方法、(5) 塩基性化合物の存在下にビニル化反応を行う、(1) ~ (4) のいずれかに記載のビニル化核酸の製造方法、(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法で得られるビニル化核酸をプライマーとして用いて PCR を行い、PCR 増幅産物としてビニル化核酸を得ることを含むビニル化核酸の製造方法、(7) ビニル基で修飾したヌクレオチド及び dNTP の存在下で、PCR を行い、PCR 増幅産物としてビニル化核酸を得ることを含むビニル化核酸の製造方法、(8) ビニル基で修飾したヌクレオチドが、アミノ基で修飾したヌクレオチドとビニル化剤をビニル化反応させて得られるものである (7) に記載のビニル化核酸の製造方法、(9) ビニル化剤がアクリル酸無水物、メタクリル酸無水物、N-アクリロイルオキシスクシンイミド及びN-メタクリロイルオキシスクシンイミドからなる群から選択される少なくとも1種である (8) に記載のビニル化核酸の製造方法、

(10) 塩基性化合物の存在下にビニル化反応を行う(8)又は(9)に記載のビニル化核酸の製造方法、である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において製造される「ビニル化核酸」とは、その核酸配列中にビニル基を有するヌクレオチドが1つ又は複数、組み込まれた核酸を表す。核酸配列中とは、核酸配列の内部及び／又は末端を意味する。また、「PCR」とはポリメラーゼ連鎖反応を意味する。

本発明のビニル化核酸は、以下の(A)～(C)のいずれかの方法により製造される。

(A) アミノ基を有する核酸をビニル化剤と反応させる。

(B) アミノ基で修飾したヌクレオチド及びdNTPの存在下、PCRを実施した後、PCR増幅産物をビニル化剤と反応させる。

(C) ビニル基で修飾したヌクレオチド及びdNTPの存在下、PCRを実施する。

(A)の方法において、「アミノ基を有する核酸」とは、例えば、アミダイト試薬を用いてDNA自動合成装置により、適当な塩基数の核酸を合成した後、最終段階で、アミノリンクTM(PEバイオシステムズ社製)のようなアミノ化試薬を反応させ、脱保護操作をすることにより合成することができる。この場合、アミノ基は核酸の末端に導入される。核酸の鎖長は、約100配列である。

100配列以上の長鎖のアミノ基を有する核酸を得たい場合、PCRによる調製が有効となる。まず、適当な鎖長の末端にアミノ基を有する核酸をDNA自動合成装置等により調製し、PCRの際のプライマーとして使用することで、長鎖の末端にアミノ基を有する核酸を合成することができる。PCRは、常法に従って行えばよい。

上述の末端にアミノ基を有する核酸を、ビニル化剤と反応させることにより、末端にビニル化が導入された核酸(末端ビニル化核酸ともいう)を得ることができる。

ビニル化剤は、アミノ基を有する核酸の良溶媒である極性溶媒、例えばジメチルスルフォキシド(DMSO)等との反応性及び核酸塩基中のアミノ基との反応性

を考慮し選択する。好ましいビニル化剤としては、アクリル基、メタクリル基等を含む化合物である。具体的には、アクリル酸無水物、メタクリル酸無水物、アクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（N-アクリロイルオキシスクシンイミド）、メタクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（N-メタクリロイルオキシスクシンイミド）等である。

反応に使用するビニル化剤の量は、反応率を考慮して設定する。経済性を考慮すると、末端にアミノ基を有する核酸に対して等モル～50倍モルが好ましい。

ビニル化における反応温度は、反応速度、反応率等を考慮して任意に設定する。好ましくは10℃～30℃である。

また、アミノ基を有する核酸のビニル化反応に際し、塩基性化合物を触媒として使用することにより、ビニル化反応の反応速度、反応収率等が飛躍的に向上する。

塩基性化合物としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム等のアルカリ（土類）金属、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム等のアルカリ（土類）金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ（土類）金属炭酸化合物、ナトリウムメチラート、マグネシウムメチラート等のアルカリ（土類）金属アルコキシ化合物、水素化ナトリウム、水素化カルシウム等のアルカリ（土類）金属水素化物、さらにはトリエチルアミン、ジアザビスクロウンデセン等の有機3級アミン等が挙げられる。また、それらを組み合わせて用いることも可能である。好ましくは、安価な炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムを挙げることができる。また、使用量は末端にアミノ基を有する核酸に対して等モル～100倍モルの範囲が好ましい。

（B）の方法において、「アミノ基で修飾したヌクレオチド」とは、アミノ基を有するヌクレオチドを表す。アミノ基としては脂肪族アミノ基が挙げられ、具体的には、5-（3-アミノアリル）-2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェート等の化合物を用いることができる。

上述のアミノ基で修飾したヌクレオチド及び dNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTP

を含む混合物)の存在下でPCRを実施することにより、PCR増幅産物として内部にアミノ基を有する核酸を取得することができる。

また、PCRに使用する1対のプライマーの両方又は片方に、例えば(A)の方法で合成したアミノ基を有する核酸を使用することにより、核酸配列の内部及び末端にアミノ基を有する核酸を取得することもできる。

得られたPCR増幅産物は、上述のように、ビニル化剤と反応させることにより核酸配列の内部及び／又は末端にビニル基が導入された核酸となる。

核酸配列中のビニル基の数は、PCRの際に添加するアミノ基で修飾したヌクレオチドの量により任意に設定することができる。PCRの際に添加するアミノ基で修飾したヌクレオチドの量は、経済性を考慮すると少ない量が好ましく、dNTPに対して1.0～10.0質量%がさらに好ましい。

(C)の方法において、「ビニル基で修飾したヌクレオチド」とは、例えば、5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェートのアクリル化物、5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェートのメタクリル化物を示すことができる。ビニル基で修飾したヌクレオチドは、アミノ基で修飾したヌクレオチドを上述のビニル剤と反応させることにより得ることができる。

上述のビニル基で修飾したヌクレオチド及びdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTPを含む混合物)の存在下でPCRを実施することにより、PCR増幅産物として内部にアミノ基を有する核酸を取得することができる。

また、PCRに使用する1対のプライマーの両方又は片方に、例えば(A)の方法で合成したビニル化核酸を使用することにより、核酸配列の内部及び末端にビニル基が導入された核酸を取得することもできる。

核酸中のビニル基の数は、上述の(B)の方法と同様、PCRの際に添加するビニル基を有するヌクレオチドの量により任意に設定することができる。PCRの際に添加するビニル基を有するヌクレオチドの量は、経済性を考慮すると少ない量が好ましく、dNTPに対して1.0～10.0質量%がさらに好ましい。

本発明において、核酸にビニル基が導入されたことは、ビニル化核酸とアクリ

ルアミド等の重合性モノマーを反応させ共重合物を作成し、該共重合物を電気泳動に供することにより確認することができる。

ビニル化核酸はアクリルアミド等のモノマーと共重合するため、電気泳動により移動しない。

このようにアクリルアミド等の重合性モノマーとの共重合物に固定された核酸は、遺伝子発現、遺伝子変異等の検出のためのプローブとして使用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、電気泳動用ゲル及びそれを用いたビニル化核酸の確認方法を示す。図中、符号1は核酸固定化ゲルを、符号2電気泳動用ゲルを、符号11～14は核酸固定化ゲル又は核酸溶液添加用ウェルを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例1

アミダイト試薬を用いてDNA自動合成装置により、atgcの核酸を合成した後、最終段階で、アミノリンク™(PEバイオシステムズ社製)を反応させ、脱保護操作を行うことにより5'-0-アミノヘキシル-atgcを合成した。

末端にアミノ基を有する核酸として、1 mMの5'-0-アミノヘキシル-atgc水溶液 10 μ l、ビニル化剤として80mMのメタクリル酸無水物溶液(DMSOに溶解) 5 μ lを用いた。これらを100 mMの炭酸ナトリウム水溶液 5 μ lと混合し、室温で1時間、ビニル化反応を行った。末端にアミノ基を有する核酸とメタクリル酸無水物のモル比は、1:40である。

液体クロマトグラフィーを使用し、以下に示す分析条件で反応率を測定したところ、反応率は100%であった。

〈液体クロマトグラフィー分析条件〉

カラム：カプセルパック C18 SG300 (4.6mm i. d. × 250mm, 5 μ m)

移動相：A：5mM トリエチルアミン酢酸 (pH7.5)

B：アセトニトリル 0→20% (40min)

検出：UV260nm

流速：1.0ml/min

実施例 2 ～ 5

実施例 1 において、メタクリル酸無水物溶液の濃度を表 1 に示す値に変更した以外は、同様に操作した。結果は表 1 に示した。

〈表 1〉

	メタクリル酸無水物 (mM)	反応率 (%)
実施例 2	20	100
実施例 3	10	99.1
実施例 4	5	97.4
実施例 5	2.5	26.5

比較例 1

メタクリル酸無水物の代わりに 100mM のメタクリル酸水溶液を使用した以外は実施例 1 と同様に操作を行った。反応終了後、液体クロマトグラフィーを使用し、反応率を測定したところ、反応率は 0% であった。

実施例 6 ～ 10

実施例 1 ～ 5 において、メタクリル酸無水物を、N-アクリロイルオキシクシンイミドに変えた以外は同様に操作し、反応率を求めた。

<表 2>

	N-アクリロイルオキシ スクシンイミド (mM)	反応率 (%)
実施例 6	80	100
実施例 7	20	99.5
実施例 8	10	90.8
実施例 9	5	90.8
実施例 10	2.5	30.1

実施例 11

アミダイト試薬を用いて DNA 自動合成装置により、tgcgatcgatctc (配列番号 1) の核酸を合成した後、最終段階で、アミノリンク™ (PE バイオシステムズ社製) を反応させ、脱保護操作を行うことにより、5'-O-アミノヘキシルー-tgcatcgatctc を合成した。

末端にアミノ基を有する核酸として、0.5mM の 5'-O-アミノヘキシルー-tgcatcgatctc 水溶液 10 μ l、ビニル化剤として 20mM のメタクリル酸無水物溶液 (DMSO に溶解) 5 μ l を用いた。これらを 100mM 炭酸ナトリウム水溶液 5 μ l と混合し、室温で 1 時間反応を行った。

実施例 1 と同様の条件で、液体クロマトグラフィーで反応率を測定したところ、反応率は 100%であった。

実施例 12

本実施例は、末端ビニル化核酸を使用した PCR による、末端ビニル化核酸の製造方法に関する。

(1) 鋳型 (染色体) の調製

ロドコッカス・ロドクロウス J1 株を栄養培地 (グルコース 15 g、酵母エキス 1 g、グルタミン酸ナトリウム 10 g、KH₂PO₄ 0.5g、K₂HPO₄ 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.5g/L、

pH7.2) 100ml で 30℃、3 日培養し、集菌した。この菌体から染色体を調製し、PCR の鑄型に用いた。なお、ロドコッカス・ロドクロウス J1 株は FERM BP-1478 として独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に昭和 62 年 9 月 18 日に寄託されている。

(2) PCR

実施例 1 1 で作製した末端ビニル化核酸及び aaaccctgacct（配列番号 2）をプライマーとして使用し、(1) で調製した染色体を鑄型として PCR を行った。aaaccctgacct（配列番号 2）はアマシャムファルマシア社に合成を依頼した。

PCR は、Ex-Taq（宝酒造社製）の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて行った。反応は 100 μl で行い、温度条件は 93℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 1 分を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。この反応によって 512 塩基の長鎖の 5' 末端ビニル化核酸（配列番号 3）が増幅された。

〔配列番号 3〕

tgcgtcgatc tctgggaacc gtacctgac tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga	60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgatcgaaa ccttgctgta	120
cgagcgaggg ctcatcacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga	180
gatcggcccg atgggcggtg ccaaggtcgt ggccaagtc tgggtggacc ctgagtaccg	240
caagtggctcgaagaggacg cgacggccgc gatggcgctca ttgggctatg ccggtgagca	300
ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tgggtgtcac	360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccg ccgccttggt acaagagcat	420
ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt	480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt	512

実施例 1 3

本実施例は、末端ビニル化核酸のアクリルアミドゲルへの固定化及び評価に関する。

表 3 に示したゲル前駆体水溶液を調製し、室温で 2 時間放置し核酸固定化アクリルアミドゲルを製造した。得られた核酸固定化ゲル 1 を 20mg 切り出した。核酸

固定化ゲル 1 20mg中には、5nmolの核酸が存在している。

<表 3>

アクリルアミド	4.8質量%
メチレンビスアクリルアミド	0.2質量%
APS (過硫酸アンモニウム)	0.1質量%
TMED ((N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン))	0.1質量%
ビニル化核酸 (実施例 1 1 で作成)	250 μ M

次に4つのウェル（容量約50 μ l）を含む電気泳動用ゲル2〔ポリマー濃度5%（アクリルアミド／メチレンビスアクリルアミド=95/5 (wt/wt)）〕を作製した。

ウェル1 1に、前記切り出した核酸固定化ゲル1を添加した。ウェル1 2～1 4には、末端ビニル化核酸（実施例 1 1 記載）の量が順に 5 nmol, 2.5 nmol, 0.5 nmol となるように溶液で添加した（図 1 参照）。

次いで、サブマリン型電気泳動装置（アトー社製 AE-6110）を用いて、50V 15分間電気泳動を行った。

アクリルアミドゲルをエチジウムブロマイドで染色し、電気泳動で移動した核酸のバンドの蛍光強度を目視で測定した。ウェル1 1から、移動した核酸（つまり、共重合しなかったビニル化核酸）のバンドの蛍光強度は、ウェル1 4の蛍光強度よりも低いことが確認された。

以上の結果から、末端ビニル化核酸のアクリルアミドゲルへの固定化率は90%以上であることを確認した。

実施例 1 4

本実施例は、長鎖の末端ビニル化核酸（配列番号 3）のアクリルアミドゲルへの固定化及び評価に関する。

4つのウェルを1つのウェルに変更した以外は実施例 1 3と同様に電気泳動用ゲルを作成した。

前記ゲルのウェル部分に表 4 の組成からなる長鎖の末端ビニル化核酸（配列番

号 3) を含むゲル前駆体溶液を添加し、室温で 2 時間放置した。

<表 4>

モノマー (アクリルアミド/メチレンビスアクリルアミド=95/5) 25質量%溶液	10 μ l
純水	20 μ l
1%APS (過硫酸アンモニウム)	5 μ l
10%TMED ((N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン))	5 μ l
ビニル化核酸 (配列番号 3)	10 μ l

得られたゲルを、縦型電気泳動装置を用いて、50V, 1 時間電気泳動を行い、その後エチジウムブロマイドで染色した。

アクリルアミドゲルの試料添加用のウェル部分 (ゲルに固定化された末端ビニル化長鎖核酸) の蛍光強度と、泳動によって移動した核酸 (ゲルに固定化されなかった末端ビニル化長鎖核酸) のバンドの蛍光強度を比較すると、ウェル部分の蛍光強度が 10 倍程度高いことが目視によって確認された。

また、末端ビニル化核酸のかわりに、末端にアミノ基を有する核酸 (5'-0-アミノヘキシル-tgcgtcgcgtc: 実施例 1 1 参照) を用いた以外は、実施例 1 2 (2) と同様に PCR を実施し、PCR 増幅産物を得た。この PCR 増幅産物を、表 4 のビニル化核酸 (配列番号 3) のかわりに使用し、上述と同様の実験を行ったところ、ウェル部分はエチジウムブロマイドによって染色されず、電気泳動によって移動したバンドのみが強く染色された。

以上の結果により、末端ビニル化核酸をプライマーとして用い、PCR を行い、得られた長鎖の末端ビニル化核酸 (配列番号 3) についても、高効率でアクリルアミドゲルに固定化できることを確認した。

実施例 1 5

本実施例は、アミノ基で修飾されたヌクレオチド及び dNTP の存在下での PCR によるビニル化核酸の製造方法に関する。

(1) PCR

実施例 1 2 (1) で調製した鋳型と、プライマーとして tgcgtcgatctc (配列番号 1) 及び aaaccctgacct (配列番号 2) を用い、PCR を行った。tgcgtcgatctc (配列番号 1) と aaaccctgacct (配列番号 2) はアマシャムファルマシア社に合成を依頼した。

PCR は、ヌクレオチドとして dNTP 1 に対して 5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェートを 0.05 の割合で加えた以外は、実施例 1 2 と同様に行った。その結果、配列の内部にアミノ基で修飾されたヌクレオチドを含む、512 塩基の長鎖の核酸 (配列番号 4) が増幅された。

〔配列番号 4〕

```

tgcgtcgatc tctgggaacc gtaacctgac tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga    60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgatcgaaa ccttgctgta    120
cgagcgaggg ctcatcacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga    180
gatcgggccc atgggcgggtg ccaaggtcgt ggccaagtc tgggtggacc ctgagtaccg    240
caagtggctcgaagaggacg cgacggccgc gatggcgta ttgggctaig ccggtgagca    300
ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tgggtgtcac    360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccgggtgt tgggtctccg cccgcctggt acaagagcat    420
ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt    480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt                                512

```

(2) ビニル基の導入

アミノ基を有する核酸として、(1) で得られた核酸 (配列番号 4) (1 nmol/ml) 10 μ l、ビニル化剤として 50mM のメタクリル酸無水物溶液 (DMSO に溶解) 5 μ l を用いた。これらを 100mM の Na_2CO_3 - NaHCO_3 水溶液 5 μ l と混合し、室温で 2 時間反応させた。

(3) ビニル化核酸のアクリルアミドゲルへの固定化及び評価

ビニル化核酸として、(2) で得られたビニル化核酸を使用した以外は実施例 1 4 と同様に操作した。

アクリルアミドゲルの試料添加用のウェル部分 (ゲルに固定化されたビニル化核酸) の蛍光強度と、泳動によって移動した核酸 (ゲルに固定化されなかったビ

ニル化核酸) のバンドの蛍光強度を比較すると、ウェル部分の蛍光強度が 10 倍程度高いことが目視によって確認された。

実施例 16

本実施例は、ビニル基で修飾されたヌクレオチド及び dNTP の存在下での PCR によるビニル化核酸の製造方法に関する。

(1) ビニル基で修飾したヌクレオチドの合成

アミノ基で修飾したヌクレオチドとして、50mM の 5-(3-アミノアリル)-2'-デオキシウリジン 5'-トリホスフェート 10 μ l (DMSO に溶解)、ビニル化剤として 50mM のメタクリル酸無水物 (DMSO に溶解) 5 μ l を使用した。これらを 100mM の Na_2CO_3 - NaHCO_3 5 μ l と混合し、室温で 2 時間反応させた。

(2) PCR

dNTP 1 に対して (1) で合成したヌクレオチドを 0.05 の割合で加えて、PCR を行った以外は、実施例 15 と同様に PCR を行った。その結果、配列の内部にビニル基で修飾されたヌクレオチドを含む、512 塩基の長鎖の核酸 (配列番号 5) が増幅された。

[配列番号 5]

```

tgcgtcgatc tctgggaacc gtacctgac tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga      60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgacgcgaaa ccttgcctgta    120
cgagcgaggg ctcacacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga      180
gatcgccccg atgggcggtg ccaaggctgt ggccaagtcc tgggtggacc ctgagtaccg      240
caagtggctcgaagaggacg cgacggccgc gatggcgctc tgggctatg ccggtgagca      300
ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tgggtgacac      360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccg ccgccttgtt acaagagcat      420
ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt      480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt                                     512

```

(3) ビニル化核酸 (配列番号 5) のアクリルアミドゲルへの固定化及び評価

ビニル化核酸として、(2) で得られたビニル化核酸 (配列番号 5) を使用し

た以外は実施例 14 と同様に操作した。

アクリルアミドゲルの試料添加用のウェル部分（ゲルに固定化されたビニル化核酸）の蛍光強度と、泳動によって移動した核酸（ゲルに固定化されなかったビニル化核酸）のバンドの蛍光強度を比較すると、ウェル部分の蛍光強度が 10 倍程度高いことが目視によって確認された。

産業上の利用可能性

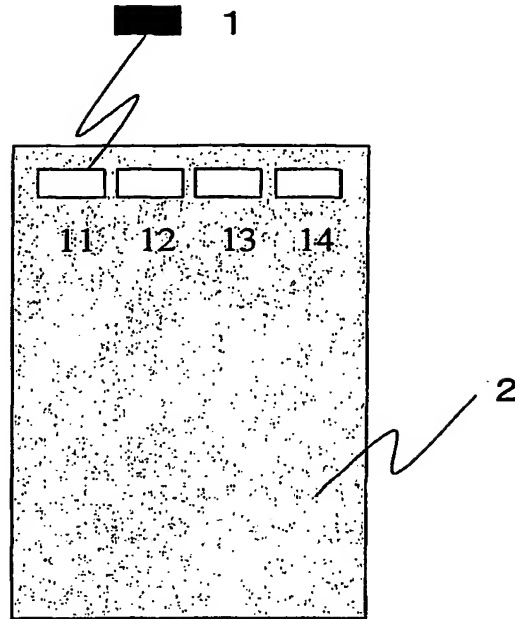
本発明によって、アミノ基を有する核酸をビニル化剤とビニル化反応を実施することにより、効率良く且つ安価にビニル化核酸を製造することができる。また、アミノ基で修飾したヌクレオチド及び dNTP の存在下で PCR を行って、得られた PCR 増幅産物にビニル基を導入する方法、又はビニル基で修飾したヌクレオチド及び dNTP の存在下で PCR を行う方法により、ビニル化核酸を効率良く且つ安価に製造することができる。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1. アミノ基を有する核酸をビニル化剤とビニル化反応させることを含むビニル化核酸の製造方法。
2. アミノ基を有する核酸がPCRにより得られるものである請求項1記載のビニル化核酸の製造方法。
3. アミノ基を有する核酸が、アミノ基で修飾したヌクレオチド及びdNTPの存在下でPCRを行い、得られるものである請求項1記載のビニル化核酸の製造方法。
4. ビニル化剤がアクリル酸無水物、メタクリル酸無水物、N-アクリロイルオキシスクシンイミド及びN-メタクリロイルオキシスクシンイミドからなる群から選択される少なくとも1種である請求項1～3のいずれかに記載のビニル化核酸の製造方法。
5. 塩基性化合物の存在下にビニル化反応を行う、請求項1～4のいずれかに記載のビニル化核酸の製造方法。
6. 請求項1～5のいずれかに記載の方法で得られるビニル化核酸をプライマーとして用いてPCRを行い、PCR増幅産物としてビニル化核酸を得ることを含むビニル化核酸の製造方法。
7. ビニル基で修飾したヌクレオチド及びdNTPの存在下で、PCRを行い、PCR増幅産物としてビニル化核酸を得ることを含むビニル化核酸の製造方法。
8. ビニル基で修飾したヌクレオチドが、アミノ基で修飾したヌクレオチドとビニル化剤をビニル化反応させて得られるものである請求項7に記載のビニル化核酸の製造方法。
9. ビニル化剤がアクリル酸無水物、メタクリル酸無水物、N-アクリロイルオキシスクシンイミド及びN-メタクリロイルオキシスクシンイミドからなる群から選択される少なくとも1種である請求項8に記載のビニル化核酸の製造方法。
10. 塩基性化合物の存在下にビニル化反応を行う、請求項8又は9に記載のビニル化核酸の製造方法。

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Rayon Co., LTD.

<120> Method of producing vinylated nucleic acid

<130> PH-1495-PCT

<140>

<141>

<150> JP2001/32030

<151> 2001-02-08

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

tgcgtc gatctc

12

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

aaaccctgac ct

12

<210> 3

<211> 512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA (5'-O-vinylated DNA)

<400> 3

tgcgctgata tctgggaacc gtacctgata tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga	60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgatcgaaa ccttgctgta	120
cgagcgaggg ctcatacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga	180
gatcggcccg atgggcggtg ccaaggtcgt ggccaagtcc tgggtggacc ctgagtaccg	240
caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca ttgggctatg ccggtgagca	300

```

ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tgggtgtgcac 360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccg cccgcctggt acaagagcat 420
ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt 480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt 512

```

<210> 4

<211> 512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

```

tgcgtcgatc tctgggaacc gtacctgac tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga 60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgatcgaaa ccttgctgta 120
cgagcgaggg ctcacacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga 180
gatcggcccg atgggcggtg ccaaggctgt ggccaagtcc tgggtggacc ctgagtaccg 240
caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca ttgggctatg ccggtgagca 300
ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tgggtgtgcac 360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccg cccgcctggt acaagagcat 420
ggagtaccgg tcccgagtgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt 480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt 512

```

<210> 5

<211> 512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

tgcgtcgatc tctgggaacc gtacctgac tctgcgtgaa aggaatacga tagtgagcga	60
gcacgtcaat aagtacacgg agtacgaggc acgtaccaag gcgatcgaaa ccttgctgta	120
cgagcgaggg ctcatcacgc ccgccgcggt cgaccgagtc gtttcgtact acgagaacga	180
gatcggcccc atgggcggtg ccaaggctcg ggccaagtcc tgggtggacc ctgagtaccg	240
caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca ttgggctatg ccggtgagca	300
ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg catcacgtgg tggtgtgcac	360
tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tggtctcccg cccgcctggt acaagagcat	420
ggagtaccgg tcccagatgg tagcggaccc tcgtggagtg ctcaagcgcg atttcggttt	480
cgacatcccc gatgaggtgg aggtcagggt tt	512

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07H21/04, 1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07H21/04, 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. .
X	JP 9-124687 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 May, 1997 (23.05.97), (Family: none)	1-10
X	JP 9-67392 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 11 March, 1997 (11.03.97), (Family: none)	1-10
A	WO 00/53736 A1 (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 14 September, 2000 (14.09.00), & EP 1158047 A & JP 2000-245460 A & JP 2000-270877 A & JP 2000-270878 A & JP 2000-270879 A & JP 2000-279177 A & JP 2001-37477 A & JP 2001-122892 A & JP 2001-136972 A & JP 2000-342298 A & JP 2001-161361 A & JP 2001-239594 A & JP 2001-248072 A & JP 2001-133453 A & JP 2001-228148 A	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 April, 2002 (17.04.02)Date of mailing of the international search report
30 April, 2002 (30.04.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07H21/04, 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07H21/04, 1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-124687 A(三菱化学株式会社) 1997. 05. 23 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 9-67392 A(三菱化学株式会社) 1997. 03. 11 (ファミリーなし)	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 04. 02

国際調査報告の発送日

30.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信



4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/53736 A1 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD.) 2000. 09. 14 & EP 1158047 A & JP 2000-245460 A & JP 2000-270877 A & JP 2000-270878 A & JP 2000-270879 A & JP 2000-279177 A & JP 2001-37477 A & JP 2001-122892 A & JP 2001-136972 A & JP 2000-342298 A & JP 2001-161361 A & JP 2001-239594 A & JP 2001-248072 A & JP 2001-133453 A & JP 2001-228148 A	1-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.